

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 1 月 29 日 (29.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/009617 A1(51) 国際特許分類⁷: C07K 7/08, 14/47, 16/18, C12N 15/12,
1/15, 1/19, 1/21, 5/10, G01N 33/563

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009059

(22) 国際出願日: 2003 年 7 月 17 日 (17.07.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-210040 2002 年 7 月 18 日 (18.07.2002) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団
法人大阪産業振興機構 (OSAKA INDUSTRIAL PRO-
MOTION ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒540-0029 大阪
府 大阪市 中央区本町橋2番5号 マイドームおおさか
内 Osaka (JP).

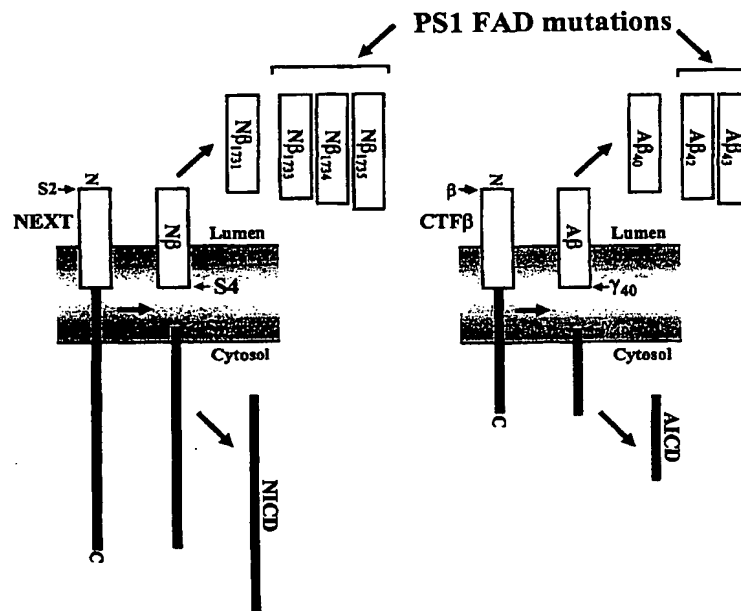
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大河内 正康
(OKOCHI, Masayasu) [JP/JP]; 〒565-0871 大阪府 吹
田市 山田丘2-2、D3 大阪大学大学院医学系研究
科・ポストゲノム疾患解析学講座・プロセッシング
異常疾患分野 (精神医学) Osaka (JP). 武田 雅俊
(TAKEDA, Masatoshi) [JP/JP]; 〒565-0871 大阪府 吹田
市 山田丘2-2、D3 大阪大学大学院医学系研究科・ポ
ストゲノム疾患解析学講座・プロセッシング異常疾患
分野 (精神医学) Osaka (JP).(74) 代理人: 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナー
ズ (IKEUCHI SATO & PARTNER PATENT ATTOR-
NEYS); 〒530-6026 大阪府 大阪市 北区天満橋1丁目8
番30号OAPタワー26階 Osaka (JP).(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,

[続葉有]

(54) Title: NOVEL Notch-ORIGIN POLYPEPTIDES AND BIOMARKERS AND REAGENTS USING THE SAME

(54) 発明の名称: Notch由来新規ポリペプチドおよびそれを用いたバイオマーカー並びに試薬



(57) Abstract: It is intended to provide extracellular markers whereby Notch signal transduction can be detected. Polypeptides (Nβ), which are novel peptides originating in Notch protein and released from cells in the step of the nuclear migration of NICD (Notch intracellular cytoplasmic domain) due to the extracellular digestion and the subsequent protein digestion in the membrane during a series of the Notch protein digestion, are referred to as markers. These peptides (Nβ) are released from the cells in proportion to the Notch signal depending on presenilin. By detecting these peptides, the Notch signal transduction, cell differentiation, cell tumorigenesis, apoptosis, Alzheimer's disease, etc. can be monitored.

[続葉有]



ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: Notchシグナル伝達を検出できる細胞外マーカーを提供する。Notchタンパク質由来の新規ペプチド群であり、前記Notchタンパク質の一連のタンパク質分解において、細胞外部分における分解に続く膜内でのタンパク質分解によりNICD(Notch intracellular cytoplasmic domain)が核内に移行する際に、細胞外に放出されるポリペプチド(Nβ)をマーカーとする。このペプチド群(Nβ)は、Notchシグナルに比例して細胞外に放出され、プレセニリン(presenilin)依存である。このペプチド群を検出することにより、Notchシグナル伝達、細胞分化、細胞の腫瘍化、アポトーシス及びアルツハイマー病等をモニターできる。

明 細 書

N o t c h由来新規ポリペプチドおよびそれを用いたバイオマーカー並びに試薬

技術分野

- 5 本発明は、N o t c hタンパク質の新規膜内タンパク質分解に由来する新規ポリペプチドおよびそれを用いたバイオマーカー並びに試薬等に関する。なお、本発明の説明において、N o t c hのタンパク質分解部分については、Site-1;S1、Site-2;S2、Site-3;S3、Site-4;S4と略記する。なお、Site-4(S4)は、後述のように、本発明者等が発見した膜
- 10 内の新規タンパク質分解部位である。

背景技術

- N o t c hは、細胞表面に存在するタイプ1膜貫通型タンパク質であり、細胞外部分にE G Fリピートを持ち、細胞内部分にアンキリンリピ
- 15 ートを含む転写調節因子であるNICD(N o t c h Intracellular Cytoplasmic Domain)を持つ。N o t c hは、細胞の分化に関する細胞間情報伝達に関与することが知られており、例えば、脳神経系の発生過程では、外胚葉系の細胞の一部が神経前駆細胞(幹細胞)に分化し、さらにニューロン細胞やグリア細胞へと分化するが、この過程において、
- 20 N o t c hを介した細胞間情報伝達が重要である。N o t c hを介した細胞間情報伝達のメカニズムは、つぎの通りである。まず、N o t c hは、N o t c hシグナル伝達の受け手側細胞のレセプターとして発現される。細胞表面に輸送されたN o t c hは、furin等のプロテアーゼで細胞外部分領域(S1)で切断されて2分子になっているが、これらはS

ーS結合で結合した状態で、そのまま細胞表面に存在する。次に、N o t c h シグナル伝達の送り手側の細胞が近接して存在した場合、その細胞表面にはN o t c h リガンド (Delta、Serrate、Lag-2のDSLファミリー等) が発現されている。これら2つの条件が整い、細胞表面でN o t c h リガンドがレセプターであるN o t c h と相互作用すると、段階的なタンパク質分解が誘導されシグナル伝達を開始される。即ち、N o t c h は細胞膜表面付近 (S 2) で切断され、さらにこの切断が引き金になって細胞膜内あるいは細胞内側の細胞膜の極めて近傍 (S 3) で切断が起こり、その結果生ずる細胞内部分であるNICDが細胞内に放出され、
10 これが核内に移行し、CSLファミリー (CPB、SuH、Lag-1 ; 転写因子) と結合することで標的遺伝子の転写を調節する。上記のS 3 部位での切断には、アルツハイマー病に関連するプレセニリンが関与している。

このように、N o t c h は、細胞分化における細胞間情報伝達に極めて重要であるが、前記脳神経系の分化の他に、細胞の腫瘍化、アポトーシス、アルツハイマー病等にも関係していることが最近明らかになり注目を集めている (例えば、大河内等 「アルツハイマー病とプレセニリンの生物学」 分子精神医学 Vol.1 No.3 2001、影山等 「N o t c h による神経分化制御」 タンパク質 酵素 核酸 Vol.45 No.3 2000、Brian
20 et.al., 「A carboxy-terminal deletion mutant of N o t c h 1 accelerates lymphoid oncogenesis in E2A-PBX1 transgenic mice」 Blood Vol.96 No.5 2000 Sep.1 p1906-1913)。したがって、N o t c h シグナル伝達の検出は、細胞分化、細胞の腫瘍化、アポトーシス、アルツハイマー病等の研究や診断に極めて重要な技術であり、その早期確立が求め
25 られている。

発明の開示

本発明は、このような事情に鑑みなされたもので、N o t c h シグナル伝達を検出するための細胞外分泌マーカーとなり得る物質の提供を、その目的とする。

5

本発明者等は、N o t c h の一連のタンパク質分解過程で、S 3 部位での切断の際、細胞膜中に残されたポリペプチドが、細胞外に放出されるという仮説を立て、その検討を行うことにした。すなわち、細胞膜中の残されたポリペプチドが細胞外に放出されるとすれば、これがN o t c h シグナル伝達のマーカーになり得るからである。本発明者等によるN o t c h シグナル伝達の一連の研究の結果、S 3 の分解箇所とは別の部位（膜貫通部分内にある）で第 4 番目の切断が生じ、この切断により生じたポリペプチドが細胞外に放出することを突き止め、本発明に至った。

15

すなわち、本発明の新規ポリペプチドは、N o t c h タンパク質由来の新規ポリペプチドであり、前記N o t c h タンパク質の一連のタンパク質分解において、細胞外タンパク質分解に続き膜内タンパク質分解によりNICD(N o t c h intracellular cytoplasmic domain)が核内に移行する際に、細胞外に放出されるポリペプチドである。このポリペプチドは、抗体等で検出できることから、N o t c h シグナル伝達を検出するためのマーカーとして使用できる。また、N o t c h シグナル伝達は、細胞分化、細胞の腫瘍化、アルツハイマー病、アポトーシス等に関連しているため、本発明の新規ポリペプチドは、これらの検出用マーカーとしても使用できる。また、後述するように、本発明の新規ポリペプチドにおいて、C 末端が異なる複数種類のポリペプチドがある。なお、以下

20

25

において、本発明の新規ポリペプチドを、「N o t c h - β (N β)」とも言う。また、前記膜内のタンパク質分解は、細胞膜に限定されず、その他の細胞のオルガネラ膜も含まれる。

5 図面の簡単な説明

図1 (A) は、N Δ E、F-N E X TおよびNICDの構成を示す図であり、図1 (B) および (C) は、本発明のFLAGタグされた新規ポリペプチド (N β) の生成の一例を示す電気泳動の写真である。

図2 (A) および (B) は、本発明の新規ポリペプチド (N β) の生成の一例を示す電気泳動の写真である。

図3 (A) は、本発明の新規ポリペプチド群の質量分析チャートであり、図3 (B) は新規のN o t c hタンパク質切断部位 (S4) の主要な部位およびアルツハイマー病アミロイド β (h β A P P) タンパク質前駆体の主要な切断部位を、それぞれ示す。

図4 (A) は、本発明の本体である新規ポリペプチドのアミノ酸配列の例を示す図である。図4 (B) はN o t c h-1~4およびh β A P Pの膜内アミノ酸配列を比較したものである。

図5 (A) および (B) は、本発明の新規ポリペプチド (N β) の細胞外放出におけるプレセニリン (P S) の機能阻害の影響の一例を示す電気泳動の写真である。

図6 (A) は、N β 放出におけるアルツハイマー病原性プレセニリン突然変異体の影響の一例を示す質量分析チャートの一例である。図6 (B) は、アルツハイマー病原性プレセニリン突然変異体の影響により分泌量が相対的増加するN β 種を示したものである。図6 (C) は、分泌量の相対的増加を半定量したものである。

図7 は、本発明の新規ポリペプチド (N β) の細胞外放出の一例およ

びその放出ペプチドのC末端がアルツハイマー病原性プレセニリン突然変異体により変化することを説明する図である。

- 図8 (A) は、N o t c h - 1 および β APPの膜貫通部分での切断の機構を示したものである。図8 (B) は、F-NEXT V 1 7 4 4 G および F-NEXT V 1 7 4 4 L 変異体を具体的にシェーマで示したものである。図8 (C) は、V 1 7 4 4 を変異させたことによる、NICD産生の阻害の一例を示す電気泳動の写真である。図8 (D) は、対応する細胞培養上清中のF-N β の分泌の一例を示す電気泳動の写真である。図8 (E) は、細胞内でのS 3 / S 4 切断の効率を測定したものである。
- 10 図9 (A) は、野生型F-NEXT、図9 (B) は、F-NEXT V 1 7 4 4 G 突然変異体、図9 (C) は、F-NEXT V 1 7 4 4 L 突然変異体から放出されたF-N β ペプチドの質量分析チャートである。

- 図10 (A) は、作成したS 4 切断部位突然変異体を具体的にシェーマで示したものである。図10 (B) および (C) は、野生型F-NEXT、F-NEXT G 1 7 3 0 - 1 7 3 3 変異体およびL 1 7 3 0 - 1 7 3 3 変異体から放出されたF-N β の分子量の一例を示す電気泳動の写真である。図10 (D) は、細胞内でのS 3 / S 4 切断の効率を測定したものである。
- 15

- 図11 (A) は、F-NEXT G 1 7 3 0 - 1 7 3 3 突然変異体、図11 (B) は、F-NEXT L 1 7 3 0 - 1 7 3 3 突然変異体から放出されたF-N β ペプチドの質量分析チャートである。
- 20

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について、さらに詳しく説明する。

25

本発明のポリペプチドは、N o t c h シグナル伝達に比例して細胞外

に放出される。しかも、この細胞外への放出の直前におこるタンパク質分解である新規タンパク質分解は、プレセニリン依存的であり、プレセニリン機能が阻害されれば、本発明のポリペプチドの放出も減少する。

- 5 本発明の新規ポリペプチドは、N o t c hタンパク質において、S 3切断部位でのタンパク質分解と同時若しくはこれと前後しておこり、S 3切断部位よりN末端側の細胞膜貫通部分でのタンパク質分解（S 4切断）により、生じて放出される。
- 10 本発明の新規ポリペプチド（N β ）のアミノ酸配列は、配列番号1から18のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。配列番号1から18において、配列番号1から9までが、マウスの配列であり、配列番号10から18までがヒトの配列である。また、配列番号1から18のアミノ酸配列は、1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であってもよい。このようなアミノ酸配列からなるポリペプチドも、N o t c hタンパク質由来であり、前記N o t c hタンパク質の一連のタンパク質分解において、細胞外タンパク質分解に続き細胞膜内タンパク質分解によりNICDが核内に移行する際に、細胞外に放出されるポリペプチドである。そして、このポリペプチドも、N o t c hシグナルに比例して細胞外に放出され、プレセニリン依存的に細胞外への放出される。なお、本発明の新規ポリペプチドは、生物から得られたものであってもよく、また人工的に合成したものであってもよい。また、前記生物の種類も限定されず、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ブタ、ウシ、ショウジョウバエ、線虫等であってもよい。
- 20 また、本発明の新規ポリペプチドの由来となる組織や細胞の種類も限定されず、即ち、未分化、分化を問わない体細胞および組織であり、例え

ば神経、骨髄、癌細胞および組織等であってもよい。

本発明のバイオマーカーは、前記本発明の新規ポリペプチドを含むものであり、N o t c h シグナル伝達、細胞分化、腫瘍、アポトーシスおよびアルツハイマー病等の検出に使用できる。なお、本発明のバイオマーカーは、その他の成分を含有していても良く、また前記新規ポリペプチドそのもの（単独）であってもよい。このバイオマーカーは、前記新規ポリペプチドを認識可能な抗体を含む試薬で検出できる。前記新規ポリペプチドを認識可能な抗体は、通常の方法で作成でき、モノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体であってもよい。前記試薬は、前記新規ポリペプチドを認識可能な抗体の他に、この抗体を抗原とする標識化抗体若しくは前記新規ポリペプチドを認識可能な標識化抗体を含んでいてもよい。前記標識化は、例えば、蛍光物質、酵素（その基質が酵素反応で発色するもの等）、放射性物質、アガロースなどの担体等で行うことができる。

本発明の遺伝子は、前記本発明の新規ポリペプチドをコードする遺伝子であり、DNA若しくはRNAである。また、本発明のベクターは、前記遺伝子を組み込んだものであり、本発明の形質転換体は、前記ベクターを用いた形質転換体である。

つぎに、本発明の新規ポリペプチドが細胞外放出される一例を、図7の左側に示す。なお、同図右側は、アルツハイマー病におけるアミロイドベータ（A β ）の細胞外放出の一例を示している。同図左側に示すように、NEXT(Notch Extracellular Truncation)のアミノ末端は、TACE(TNF β -Converting Enzyme)による細胞外切断により生成される。S2部位で

切断されたNEXTは、さらに、S 3 部位の切断により、N I C D が核内に移行し、これと同時若しくは前後して、S 4 部位の切断（本発明者等が初めて見出した第 4 の N o t c h のタンパク質分解部位）により、N β （本発明の新規ポリペプチド）が、細胞外に放出される。

5

つぎに、本発明の新規ポリペプチド（N β ）のC末端のアミノ酸配列の例を、図 4（B）に示す。同図には、マウスの 4 種類の N o t c h（ μ N o t c h-1~4）、ヒトの 4 種類の N o t c h（hN o t c h-1~4）および h β APP における、それぞれの N β 若しくは細胞外放出フラグメントのC末端周辺の配列を示している。図示のように、主要な S 4 切断部位は、推定膜貫通ドメイン（TM）領域において、数アミノ酸残基ほどN末端側に位置する（図において、左側の三角矢印で示す）。図示のように、主要な切断部位周辺のアミノ酸配列は、 μ N o t c h-1~4の間で保存されていなかったが、S 3 切断部位であるバリニン 1 7 4 3 は保存

10

15

されていた（図において、右側の三角矢印で示す）。このように、S 4 切断部位は、S 3 と異なり多様性があるのが特徴である。この多様性は、S 4 セクレターゼの切断配列認識機構が特殊であることを反映していると推察される。

20 実施例

以下、本発明の実施例について説明する。なお、実施例における試薬、材料および実験手法は、以下のとおりである。

（試薬）

25 γ -セクレターゼ（ γ -Secretase）阻害剤である、[(2R, 4R, 5S)-2-Benzyl-5-(Boc-amino)-4-hydroxy-6-phenyl-hexanoyl]-Leu-Phe

-NH₂は、Bachem社から購入した。

(プラスミド)

C末端に6回連続するc-myc配列を付加したNotchΔE-M1727V
5 (NΔE)およびNICDをコードするcDNAを、プラスミドpcDNA3 hygroに
挿入したものは、Schroeter等の方法により調製した (Schroeter, E.H.,
Kisslinger, J.A., Kopan, R. (1998). Notch-1 signalling
requires ligand-induced proteolytic release of intracellular
domain. Nature. 393, 382-386.)。なお、前記cDNAは、R. Kopan
10 博士から提供されたものを使用した。N末端にFLAG配列を付加したNEXT
、即ちFLAG-NEXT (F-NEXT)は、2段階の部位特異的突然変異誘発 (2-step
site-directed mutagenesis) により調製した。第一段階では、F-NEXT M
1 7 2 7 V (F-NEXT M 1 7 2 7 V)を、部位特異的突然変異誘発キット (ExSite PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit、Stratagene社) を
15 用いて製造した。その際、NΔEを鋳型として使用し、また、下記の2つ
のプライマー1、2 (配列番号19、20) を調製した。

プライマー1 :

5-P-ATCGTCGTCCTTGTAGTCTCTCAAGCCTCTTGCGCCGAGCGCGGCAGCAGCGTTAG-3'

20 プライマー2 :

5-P-GACAAGATGGTGATGAAGAGTGAGCCGGTGGAGCCTCCGCTGCCCTCGCAGCTG-3'

第二段階では、F-NEXTを、部位特異的突然変異誘発キット (Quick Change
Site-Directed Mutagenesis Kit、Stratagene社) を使用して、部位特
25 異的突然変異誘発により調製した。その際、F-NEXT M1727Vを鋳型とし
て使用し、また、下記の2つのプライマー3、4 (配列番号21、22

) を調製した。

プライマー 3 ; 5-CCTCGCAGCTGCACCTCATGTACGTGGCAGCG-3'

プライマー 4 ; 5-CGCTGCCACGTACATGAGGTGCAGCTGCGAGG-3'

5

これらの変異体について、塩基配列を決定（シーケンス）し、突然変異誘発が成功したことを確認した。

（抗体）

- 10 ポリクローナル抗体（L 6 5 2）は、ヒト N o t c h - 1 の V 1 7 2 2 から G 1 7 4 3 の間のアミノ酸配列（S 2 部位から S 3 部位の間の配列）のポリペプチドに対する抗体である。この抗体（L 6 5 2）は、次のようにして作製した。まず、抗原となる前記ポリペプチドを準備した。このポリペプチドは、疎水性アミノ酸を多く含んでいることが特徴である。
- 15 このため、アルツハイマー病アミロイド β タンパク質に対する抗体作成時に利用したのと同じ方法で抗体を作成した。即ち、キャリアタンパク質と結合させずに直接水溶し、同容積のリン酸バッファー（2 倍濃度）を加え、アジュバントと共に乳化し、この乳化物をウサギに注射した（Wild-Bode, C., Yamazaki, T., Capell, A., Leimer, U., Steiner,
- 20 H., Ihara, Y., Haass, C. (1997). Intracellular generation and accumulation of amyloid beta-peptide terminating at amino acid 42. J Biol Chem 272, 16085-16088）。抗 c - m y c モノクローナル抗体（9E10）および抗 F L A G モノクローナル抗体をアガロースに共有結合させた試薬（M 2 -アガロース）は、市販品を使用した。

25

（培養細胞および細胞株）

ヒト胎児腎臓293細胞（K293細胞）、N2a細胞およびCOS細胞を、10%ウシ胎仔血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、200 μ g/mlゼオシン（zeocin；PS1発現を選択するため）および100 μ g/mlハイクロマイシン（hygromycin；NΔEおよびF-NEXT発現を選択するため）を添加したDMEM培地にて培養した。K293細胞はPS1野生型、PS1 L286VおよびPS1 D385Nを安定に発現する（Okochi et al, 2000, Kulic et al, 2000, Wolfe et al, 1999）。NΔEおよびF-NEXTの細胞への導入は、商品名Lipofectamine 2000（Invitrogen社）を用いて行った。

10

（パルス-チェイス実験）

NΔEを発現する細胞から、NΔEのN末端フラグメント（NTF：Nβ）が放出されるかを判断するために、NΔEおよびNICDを安定的に導入したK293細胞を、10cmディッシュ中で、コンフルエントな状態まで培養した。そして、その細胞を、MEMビタミン溶液（Gibco社）と非標識アミノ酸を添加したイーグルとの平衡塩溶液中に300 μ Ciの 3 H]アミノ酸（トリチウム化アミノ酸混合液；tritiated amino acid mixture, Amersham社）を加えた培養液中で、代謝的にパルスラベルを2時間行い、その後、10%FCS/DMEMで6時間チェイスした。Nβが放出されるかどうか判断するため、F-NEXTを発現する細胞を、最初に、メチオニン非含有培地で40分間メチオニン飢餓状態で培養し、ついで、メチオニン非含有DMEMにおいて、400 μ Ciの 35 S]アミノ酸混合液（Redivue Promix, Amersham社）で1時間パルスラベルをし、つづいて、過剰量の非標識メチオニンを添加した10%FCS/DMEMを含むチェイス培地で、種々の時間、チェイスした。

25

(免疫沈降/SDS-PAGE)

チェイス期間の終了後、培地を集めて直ちに氷上においた。ついで、
3000×gで遠心分離を行い、細胞残屑を排除した。次に、プロテア
ーゼ阻害剤カクテル(1:1000;Sigma社)および0.025%のアジ化ナト
5 リウムを加えた。その試料を、L652またはM2-アガロース(Sigma
社)を用いて、一晚免疫沈降を行い、ついで、0.1%SDS、0.5
%deoxycholic acidおよび1% TritonX-100を含むRIPAバッファーで三
回洗浄した。そのあとに、トリス-トリシン10~20%勾配ゲル
(Invitrogen社)を使用してSDS-PAGEを行った。細胞は、氷冷PBS中でか
10 き集め、1500×gの遠心分離によって分離収集し、10倍濃度の前
記RIPA 100μlで溶解した。そして、プロテアーゼ阻害混合液(1:
500;Sigma社)を含む900μlのPBSを、前記溶解した細胞に加え
た。不溶画分は、15000×gの遠心分離で分離し、その上清を免疫
沈降に使用した。免疫沈降用の試料は、プロテインAセファロース
15 (protein A sepharose; Sigma社)で前処理し、9E10またはM2-ア
ガロースで免疫沈降した。次に、洗浄したタンパク質試料を、8%若し
くはトリス-トリシンSDS-PAGEにて分離した。ゲルを固定した後、増
幅蛍光写真撮影法試薬 (Amplify Fluorographic Reagent, Amersham社
) 中で振とうし、ついで乾燥し、最後にオートラジオグラフィーを行っ
20 た。

(免疫沈降/MALDI-TOF/MS解析)

F-NEXTおよびその派生物を安定に発現する細胞をコンフルエントな状
態まで20cmディッシュで培養した後、培養培地を新しい10% FCS
25 S/DMEMと取り替えた。CO₂インキュベーター中で3時間培養し
た後、培養上清を集めてすぐに氷上におき、そして、遠心分離で細胞残

屑を除去した。プロテアーゼ阻害混合液（1：1000）および0.025%アジ化ナトリウムを添加した後、その培地を、M2-アガロースを使用して、4時間、4℃で免疫沈降した。そして、試料を、0.1% n-octylglucoside、140mM NaCl、10mM Tris（pH 8.0）および0.025%アジ化ナトリウムを含むMS洗浄バッファーを使用して、10分間、4℃で3回洗浄した。そして、さらにもう一回、0.025%アジ化ナトリウムを含む10mM Tris（pH 8.0）で洗浄した。その結果得られた沈殿に結合したペプチドを、 α -cyano-4hydroxy cinnamic acidで飽和したTFA／アセトニトリル／水（TFA：アセトニトリル：水＝1：20：20）で溶出した。可溶化した試料を、ステンレスプレート上で乾燥させ、MALDI-TOF/MS解析にかけた。MSピークは、アンギオテンシン（Sigma社）およびインシュリン β 鎖（Sigma社）で較正した。

15 （実施例1）

培養上清中における、FLAG-NEXT (F-NEXT) のN末端フラグメント（NTF;F-N β ）の検出

図1（A）に、N Δ E、NICDおよびF-NEXTの構成を示す。図示のように、F-NEXTでは、NEXTのN末端にシグナルペプチドとそれに続くFLAG配列および2つのメチオニンが挿入されている。F-NEXTでは1727番目のアミノ酸残基に変異を加えていないが、N Δ E（マウスNotch-1（mNotch-1））中では、図中の逆三角で示すように、メチオニン1727をバリンへ人為的に変異させてある（Schroeter, E.H., Kisslinger, J.A., Kopan, R. (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. Nature. 393, 382-386.）。三角矢印は、S3タンパク質分解部位を示す。

NΔEおよびF-NEXTを安定に発現する細胞を、1時間 [^{35}S] でパルスラベルし、図1 (B) に示す時間チェイスした。その結果得た細胞の溶解物を9E10で免疫沈降し、8% SDS-PAGEで解析した。図1 (B) の上パネルに示すように、2時間チェイスした後、NΔE(パネル中央)およびF-NEXT(パネル右) においてタンパク質分解が観察され、NΔEおよびF-NEXTのバンドよりも速く移動するNICDバンドの生成が認められた。NICD生成効率は、NΔEまたはF-NEXTを発現させた場合で違いがなかった。

つぎに、前記培養上清を、M2-アガロースで免疫沈降し、8% SDS-PAGEで解析した。図1 (B) の下パネルに示すように、約4 kDaのF-Nβ (本発明の新規ポリペプチド群の集合体) のバンドが、F-NEXTを安定に発現する細胞を2時間チェイスした培地からのみ同定された。このことは、NICD生成時にその反対側のアミノ末端フラグメントが細胞外に分泌されているという全く新しい知見を示す。

F-NEXTを発現する細胞を、 [^{35}S] で1時間パルスラベルし、図1 (c) に示した時間チェイスした。培地および溶解物中のF-Nβを、上記の実験手法により調べた。図1 (C) に示すように、F-Nβ (本発明の新規ポリペプチド群の集合体) の蓄積が、培地中ではチェイス時間の延長に応じて観察されたが、細胞溶解物中では殆ど検出できなかった。なお、電気泳動ゲルの写真撮影の露光時間を長くすると、培地中と同じ分子量のF-Nβバンドが溶解物中でも検出できた (図示せず)。

図1 (B) および (C) に示した結果は、F-NEXT M1727V変異体を使用した場合、または発現細胞としてCHO、COS、N2aを用いた場合に

再現できた（図示省略）。

（実施例 2）

培養培地中における、NΔEのN末端フラグメント（NTF：Nβ）の検

5 出

NΔEまたはNICDを安定に発現するK 2 9 3細胞を、 $[^3\text{H}]$ で2時間パ
ルスラベルし、6時間チェイスした。チェイス培地および細胞溶解物を
抗NΔE抗体であるL 6 5 2で免疫沈降し、その試料をトリスートリシン
SDS-PAGEで分離した。図2（A）に示すように、分子量3～4 kDaのNΔ
10 EのNTFバンド（三角矢印）は、NΔEを発現する細胞の培養上清からは検
出されたが、NICDを発現する細胞の培養上清および細胞溶解物中には認
められなかった。このことから、このバンドはFLAGタグされていない野
生型のNβであると考えられた。

15 上記と同じ培地および溶解物を、抗c-myc抗体(9E10)を使用して
、免疫沈降した。図2（B）の下パネルに示すように、約100 kDa
のNΔEおよびNICDのバンドが、溶解物中では検出されたが（三角矢印）
、培地中では検出されなかった。この結果は、NΔEおよびNICDがほぼ同
じ速度で各細胞に発現していることを示している。

20

（実施例 3）

培養上清に放出されたNβのC末端の決定

図3（B）に、マウスN o t c h-1 (mN o t c h-1) およびヒトβAPP
(hβAPP)の膜内切断の概略を示す。mN o t c h-1は、膜内切断により
25 、NICDとNβを生じる。この実施例では、Nβの分泌およびそのC末端に
新規のタンパク質切断部位を確認した。一方、hβAPPは、膜内切断によ

り、細胞内フラグメントCTF γ 50 (Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M.M., Teplow, D.B., Haass, C. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep.* 2, 835-841.) と、数種類のA β フラグメントを生じる。

F-NEXTを安定に発現する細胞の培養上清を、M2-アガロースで免疫沈降し、上記の実験手法により、N β の分子量をMALDI-TOF/MSを使用して解析した。その結果を、図3 (A) グラフ (大) に示す。図示のように、分子量4000を中心に、多数のピークが観察されたが、4500より多い分子量の顕著なピークは確認されなかった。分子量3000から4500のピークの詳細を図3 (A) のグラフ (小) に示す。同じ主要なピークは、CHO、COSおよびN2aを宿主細胞として使用した場合でも確認された (図示せず)。また、これらのピークは、F-NEXT M1727V変異体を感染させた場合でも確認された (図示せず)。

図4 (A) に図3 (A) グラフ (小) に示したMALDI-TOF/MSのピークに一致するN β のアミノ酸配列を示す。主要なN β のC末端は、アラニン1731である。太文字は、主要ピークのアミノ酸配列を示す。図示のように、S3切断部位に一致する5060付近の分子量のピークは、確認されなかった。この結果から、N β は細胞外に放出され、その放出の直前に起こるタンパク質の分解部位はこれまで報告された3つのタンパク質分解部位 (S1、S2、S3) とは異なる、新規の第4のタンパク質分解部位 (S4) であると結論できる。

図4 (B) はヒト (h) とマウス (m) の N o t c h - 1 ~ 4 タンパク質膜貫通部分のアミノ酸配列を列挙したものである。S 1、S 2、S 3切断が N o t c h - 1 ~ 4 に共通した現象であり、また、種によらない共通したシグナル伝達機構であることから、S 4切断もすべての N o t c h 5 h 関連タンパク質に共通する現象であると推測できる。図示のように S 4 部位は S 3 部位と同じように部分的に保存されていることから、この S 4 切断が、N o t c h - 1 ~ 4 タンパク質に共通する現象であると推察できる。

10 (実施例 4)

N β 細胞外放出のプレセニリン (PS) 機能依存性の確認

P S 1 野生型およびプレセニリン機能を人工的に消失させた突然変異体 (P S 1 dominant negative mutant) である P S 1 D 3 8 5 N を発現する細胞に、F-NEXT を安定的に感染させた。そして、これらの P S 1 15 派生物と F-NEXT とを同時に発現する細胞から放出される N β のレベルを、[³⁵S] で 1 時間パルスし、ついで、2 時間チェイスした培養上清および細胞溶解物を解析することにより調べた。まず、チェイス培地を M 2 -アガロースで免疫沈降し、N β 放出を検出した。図 5 (a) の上パネルに示すように、P S 1 D 3 8 5 N 発現細胞からの N β の放出が、P S 1 20 野生型発現細胞と比較して著しく減少した。即ち、プレセニリン機能を人工的に消失させた突然変異体発現細胞では S 4 切断効率が著しく減少することが確認できた。また、同時に採取した細胞溶解物を、9E10 を使用して免疫沈降した。図 5 (A) の下パネルに示すように、2 時間のチェイス期間後の NICD バンドが、P S 1 D 3 8 5 N 発現細胞ではほとんど 25 見ることができなかった。即ち、プレセニリン機能を人工的に消失させた突然変異体発現細胞では、S 3 切断効率が著しく減少するという報

告を同時に再現することができた。

つぎに、F-NEXTを安定に発現する細胞を、プレセニリンの活性中心に結合する γ -セクレターゼ阻害剤（L 6 8 5, 4 5 8）を加えた場合と、加えない場合とで、1時間ラベルし、2時間チェイスした。すなわち、1 μ MのL 6 8 5, 4 5 8を、メチオニン飢餓状態にする2時間前に培養培地に加えると同時に、パルスーチェイス期間中、使用する各培地に同濃度のL 6 8 5, 4 5 8を含ませた。チェイス培地をM 2-アガロースで免疫沈降し、N β 放出を検出した。図5（B）の上パネルに示すように、 γ -セクレターゼ阻害剤により、N β の細胞から放出が著しく減少した。また、それに相当する溶解物を9E10で免疫沈降した。図5（b）下パネルに示すように、2時間のチェイス期間後のNICDバンドが、S 3切断阻害によって、ほとんど確認できなかった。これらの結果から、N β の細胞外への放出はプレセニリン依存性タンパク質分解の働きによるものであり、プレセニリンの機能が阻害されると、S 4切断およびそれに引き続くN β の放出も阻害されるといえる。

（実施例5）

20 家族性アルツハイマー病（FAD）関連プレセニリン（PS）突然変異体のS 4切断への影響

これまでFADに関連するPSの突然変異が分析された結果、すべての例でA β 42分泌の増加が確認されている。この実施例では、PS依存的S 4タンパク質分解も、FAD関連PS突然変異に関係していることを確認した。

25

野性型（wt）PS 1若しくはFAD関連PS 1突然変異であるPS 1

C 9 2 S、P S 1 L 1 6 6 PおよびP S 1 L 2 8 6 Vを発現するK 2 9 3細胞に、F-N E X Tを安定的に感染させた。そして、MALDI-TOF/MSにより、F-N β のC末端の変化を確認するために、P S 1派生物およびF-N E X Tを発現する細胞の培養上清を分析した。図6 (A)に示すように、N β のC末端タンパク質分解パターンの特徴的変化が、野性型P S 1に比較してF A D突然変異P S 1発現細胞で確認できた。特に、A β 4 2生成が極めて増加しているP S 1 L 1 6 6 P突然変異では、F-N β ペプチドを長くする傾向が見られ、F-N β 1 7 3 1より2および4アミノ酸残基長いF-N β 種 (F-N β 1 7 3 3、1 7 3 5)の生成の増加が確認できた (図6 (B) 参照)。また、図6 (A)に示すように、P S 1 C 9 2 Sでは、F-N β 1 7 3 4のレベルが増加し、P S 1 L 2 8 6 Vでは、F-N β 1 7 3 5のレベルが増加し、かつF-N β 1 7 3 4のレベルが減少した。これらの結果から、F A D突然変異により、S 4切断部位のパターンは影響を受け、C末端側にペプチド長が伸びる傾向があることが確認された。A β 4 2と同様に、アグレッシブなP S 1 L 1 6 6 P突然変異が、F-N β のペプチド長に最も影響を与える。なお、P S 1 L 1 6 6 Pは、成人初期のF A Dを引き起こすことが知られている。これらの効果は、K 2 9 3細胞に限られず、Neuro2a細胞においても、F A D関連P S突然変異の同様の効果が確認できた (データ図示せず)。以上のことから、全てのF A D突然変異は、F-N β のC末端に対し、影響を及ぼすといえる (図6 (C) 参照)。

(実施例6)

25 S 3 部位でのタンパク質分解のS 4 部位でのタンパク質分解効率への影響

膜内での二箇所の切断のうち、N o t c h - β ペプチドを産生する S 4 部位でのタンパク質分解と、シグナル伝達量を規定するNICDを産生する S 3 切断との関係について検討を行うために、この実施例では、S 3 部位でのタンパク質分解を阻害する突然変異体を作成し、人工的に S 3 5 部位での切断効率を減少させた場合でも、S 4 での切断効率は変化しないことを確認した。

N o t c h -1 の S 3 切断部位の C 末端側にある V 1 7 4 4 を変異させると、S 3 での切断が部分的に阻害されることが報告されている
10 (Schroeter et al., Nature, 1998)。このことから、まず、S 3 部位での切断を阻害した場合における、S 4 切断活性の変化について検討を行った。膜内タンパク質分解による生成物を効率よく認識するために、NEXT 類縁体の N 末端側に FLAG タグを、そして C 末端側に myc タグをつけ、ついで、前記類縁体を発現するプラスミド (F-NEXT; Okochi, 2002) のバリ
15 ン 1 7 4 4 をグリシンまたはロイシンに変異させた(以下、F-NEXT V 1 7 4 4 G および F-NEXT V 1 7 4 4 L という)(図 8 (B))。S 3 切断部位の突然変異を持つあるいは持たない F-NEXT 発現コンストラクトを、野生型 P S 1 または γ -セクレターゼ機能を欠いた P S 1 D 3 8 5 N を恒常的に過剰発現させた K 2 9 3 細胞に安定的に感染させた。そしてそれら
20 の細胞を ^{35}S メチオニンでのメタボリック・ラベル実験を行い、その細胞沈査中およびそれに対応する細胞培養上清中の放射線標識された新規の F-N β および NICD を、免疫沈降法および電気泳動による分離後の放射線量測定を組み合わせで検出した (IP-autoradiography)。

25 前記細胞沈査に 30 分間パルス刺激を与え、抗 c - m y c 抗体 (9E10) で IP-autoradiography を行ったところ、F-NEXT の発現が認められた。

さらにその細胞を 2 時間チェイスしたところ、F-NEXTの分解によるNICD生成が認められたが、V 1 7 4 4 GおよびV 1 7 4 4 L変異体では有意に阻害されていた（図 8（C）の上パネル）。この結果は、今までの報告と同一であった。プロテアゾーム阻害薬であるラクタシスチンを加えることでNICDの分解を阻害した場合においても、V 1 7 4 4 G変異体発現細胞およびV 1 7 4 4 L変異体発現細胞における 2 時間チェイス後の放射線標識されたNICD量は、有意に少なかった。このF-NEXTによる膜内タンパク質分解およびNICD生成は、P S 1 D 3 8 5 N発現細胞では完全に消失した（図 8（C）の下パネル）。これらのことより、図 8（C）の上パネルで認められたタンパク質分解が、PS/ γ -セクレターゼにより生じたといえる。

つぎに、2 時間チェイス後の細胞培養上清を、抗FLAG抗体（M 2）を用いて解析した。F-NEXT V 1 7 4 4 G変異体発現細胞およびF-NEXT V 1 7 4 4 L変異体発現細胞から分泌されたF-N β は、野生型F-NEXT発現細胞からのそれとほぼ同じレベルであった（図 8（D））。また、P S 1 D 3 8 5 N変異体発現細胞からはF-N β の生成は認められなかった。以上のことから、PS/ γ -セクレターゼが、この切断に影響を及ぼすといえる。

これらの結果をさらに強固にするために、S 3 およびS 4切断の効率を算出した。細胞沈査中のF-NEXT類縁体に対するNICDの割合、および細胞沈査中のF-NEXT類縁体に対する細胞培養上清中のF-N β の量比を測定した。その結果、野生型に比較してV 1 7 4 4 G変異体およびV 1 7 4 4 L変異体は、共にS 3切断活性を低下させるが、S 4切断活性には影響を及ぼさないことが確認された（図 8（E））。

(実施例 7)

S 3 切断効率の低下と S 4 切断の正確さとの関係

アルツハイマー病の原因となる P S 1 の突然変異体では、S 4 切断の正確さの変化と共に S 3 切断の活性の減少が起こる。S 3 切断が S 4 切断の前提条件であるならば、P S 1 の突然変異体による S 3 切断効率の減少が S 4 切断の正確さに影響を及ぼすと考えた。そこで、この実施例では、S 3 切断部位の突然変異体を作成し、人工的に S 3 での切断効率を減少させた場合においても、S 4 での切断の正確さが変化しないことを確認した。

10

PSの家族性アルツハイマー病 (FAD) 型変異体が、PS/ γ -セクレターゼによるタンパク質分解の正確さに影響を及ぼし、さらに延長型A β であるA β 42の産生を増大させることが、FAD発症の原因となっていると考えられている。同様に、PSのFAD変異体は、PS/ γ -セクレターゼによる N o t c h の切断の正確さに影響を及ぼし、延長型F-N β の産生を増大させる。さらに、いくつかのPS変異体が、S 3 切断効率を減少させることが報告されている。そこで、S 3 切断効率を減少させる S 3 変異体の S 4 切断の正確さへの影響について検討を行った。野生型F-NEXT発現細胞、F-NEXT V 1 7 4 4 G 変異体発現細胞またはF-NEXT V 1 7 4 4 L 変異体発現細胞の細胞培養上清中のF-N β を、M 2 -アガロースを用いて免疫沈降し、MALDI-TOF/MSで解析した。この結果、図 9 (B) および (C) に示したとおり、F-NEXT V 1 7 4 4 G 変異体および V 1 7 4 4 L 変異体では、野生型と同じく、アラニン 1 7 3 1 とアラニン 1 7 3 2 との間が主な切断部位であって、幾つかに分散する副次的な S 4 切断のパターンにはなんら影響を及ぼさなかった。すなわち、S 3 切断を減少させる変異は、S 4 切断部位の正確さに何ら影響を及ぼさないことが確認

20
25

された。このことより、FAD型のPS変異が、間接的にS4切断の正確さに影響を与えていると考えられた。

(実施例8)

5 S4切断効率の減少のS3切断効率への影響

S4切断部位変異体が、前述のS3の人工的点突然変異体と同様の効果を発揮するのではないかと考え、S4切断部位周辺の4つのアラニン残基をグリシン残基またはロイシン残基に変異させたF-NEXT G1730-1733変異体およびL1730-1733変異体(図10(A))
10)を作成し、S4切断効率の減少のS3切断効率への影響について検討を行った。その結果、S4切断部位変異体のうちS4切断活性を阻害したL1730-1733変異体では、S3切断効率が減少した。この結果は、Notch-1の膜内タンパク質分解において、S4切断に依存的なS3タンパク質分解によりNICDが産生されるタンパク質分解経路が
15 存在することを示している。

つぎに、S4切断についてもS4切断部位変異体が同様の効果を発揮するのではないかと考えた。図10(A)中の三角矢印で示すように、NotchのS4切断部位は4つの連続するアラニン残基のちょうど中
20 間に位置する。この4つのアラニン残基をグリシン残基またはロイシン残基に変異させたF-NEXT G1730-1733およびL1730-1733を作成した。S3変異体の場合と同様に、パルスチェイス実験を行った。2時間チェイス後の細胞培養上清中の放射線標識されたF-Nβについて検討を行った。野生型およびS4変異型F-NEXTを発現させた細胞
25 から、F-Nβの分泌が観察された(図10(B))。しかしながら、新規のF-Nβ産生量は、野生型に比較してF-NEXT G1730-1733変異

体では殆ど変化がなかったが、F-NEXT L 1 7 3 0 - 1 7 3 3 変異体では減少しているように見えた（図 1 0 （B））。

つぎに、対応する細胞沈査中に含まれるF-NEXTからの放射線標識されたNICD生成について検討を行った。その結果、G 1 7 3 0 - 1 7 3 3 変異体発現細胞では、野生型F-NEXT発現細胞と同程度のNICD生成が認められたのに対し、L 1 7 3 0 - 1 7 3 3 変異体発現細胞でのNICD生成は、野生型に比較して減少した（図 1 0 （C）の上パネル）。このことから、L 1 7 3 0 - 1 7 3 3 変異体では、S 3 切断が阻害されていることが考えられた。

この結果を立証するために図 8 （E）と同様の方法でS 4 / S 3 効率を計算した。その結果、S 4 変異体のうち、S 4 活性にほとんど影響を与えなかったG 1 7 3 0 - 1 7 3 3 変異体は、S 3 切断活性に何の影響も与えなかった（図 1 0 （D））。ところが、S 4 活性を阻害したL 1 7 3 0 - 1 7 3 3 変異体は、S 3 切断効率を減少させることが確認された（図 1 0 （D））。また、PS/ γ -セクレターゼ機構は、S 3 / S 4 のどちらの部位でも切断し、膜貫通部分の細胞膜近傍での切断であるS 3 切断とそのほぼ中央部分での切断であるS 4 切断との間の中間分解物が見つかっていないことから、S 3 部位とS 4 部位とが、ほぼ同時に切断されることが考えられた。これらのことから、Notch-1の膜内タンパク質分解において、S 4 切断に依存的なS 3 タンパク質分解によりNICDが産生されるタンパク質分解経路が存在すると考えられる。

25 （実施例 9）

S 4 切断部位と活性との関係

続いて、F-N β G 1 7 3 0 - 1 7 3 3 および F-N β L 1 7 3 0 - 1 7 3 3 の C 末端を決定した。F-NEXT G 1 7 3 0 - 1 7 3 3 から放出される F-N β 量は、野生型 F-NEXT 発現細胞からのそれとほぼ同等であった（図 10 (B)）が、図 11 (A) の逆三角で示すように、G 1 7 3 0 - 1 7 3 3 変異体の S 4 切断部位は、グリシン 1 7 3 1 とグリシン 1 7 3 2 の間ではなかった。この変異体の主な S 4 切断部位は、4 つ連続するグリシン残基の C 末端側に移動し、フェニルアラニン 1 7 3 4 とバリン 1 7 3 5 の間、バリン 1 7 3 5 とロイシン 1 7 3 6 の間、フェニルアラニン 1 7 3 8 とバリン 1 7 3 9 の間に位置していた。すなわち、S 4 切断は、グリシン残基の前後で起こらず、副次的な切断部位が、4 つのグリシンの N 末端側に分布し、F-NEXT G 1 7 3 0 - 1 7 3 3 から放出される F-N β の分子量は増加した（図 10 (B)）。また、F-NEXT L 1 7 3 0 - 1 7 3 3 変異体の主要な S 4 切断部位は、図 11 (B) の逆三角で示すように、野生型 F-NEXT と同様のトポロジーの 4 つの連続するロイシン残基の中間、すなわちロイシン 1 7 3 1 とロイシン 1 7 3 2 の間であり、副次的な切断部位は、殆ど認められなかった。また、F-NEXT L 1 7 3 0 - 1 7 3 3 変異体から放出される F-N β の分子量は減少した（図 10 (B)）。

20 産業上の利用可能性

以上のように、本発明の新規ポリペプチドは、N o t c h タンパク質由来であり、前記 N o t c h タンパク質の一連のタンパク質分解において、細胞外におけるタンパク質分解に続く膜内タンパク質分解により NICD が核内に移行する際に、細胞外に放出されるポリペプチドである。この新規ポリペプチドをマーカーとすることにより、N o t c h シグナル伝達を検出することができ、例えば、細胞分化、細胞の腫瘍化、アポトー

シス、アルツハイマー病等を検出することもできる。

請求の範囲

1. Notchタンパク質由来の新規ポリペプチドであり、前記Notchタンパク質の一連のタンパク質分解において、細胞外タンパク質
5 分解に続き膜内タンパク質分解によりNICD(Notch intracellular cytoplasmic domain)が核内に移行する際に、細胞外に放出されるポリペプチド。
2. Notchシグナル伝達に比例して細胞外に放出される請求の範囲
10 1記載のポリペプチド。
3. 細胞外への放出が、プレセニリン依存的タンパク質分解により生ずる請求の範囲1または2記載のポリペプチド。
- 15 4. Notchタンパク質において、S3でのタンパク質分解と同時若しくはこれと前後しておこる、S3よりN末端側の細胞膜貫通部分でのタンパク質分解(S4切断)により、生じて放出される請求の範囲1から3のいずれかに記載のポリペプチド。
- 20 5. Notchタンパク質において、S3よりN末端側の部分でのタンパク質分解部位(S4)が、細胞膜貫通部分のアミノ酸残基部分である請求の範囲4記載のポリペプチド。
- 25 6. 配列番号1から配列番号18の少なくとも一つの配列番号のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

7. 配列番号 1 から配列番号 18 の少なくとも一つの配列番号のアミノ酸配列において、1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、N o t c h タンパク質由来であり、前記 N o t c h タンパク質の一連のタンパク質分解において、細胞外タンパク質分解に続き膜内タンパク質分解により NICD が核内に移行する際に、細胞外に放出されるポリペプチド。
8. N o t c h シグナルに比例して細胞外に放出される請求の範囲 7 記載のポリペプチド。
9. 細胞外への放出が、プレセニリン (Presenilin) 依存的タンパク質分解により生じる請求の範囲 7 または 8 記載のポリペプチド。
10. 請求の範囲 1 から 9 のいずれかに記載のポリペプチドを含むバイオマーカー。
11. N o t c h シグナル伝達、細胞分化、腫瘍、アポトーシスおよびアルツハイマー病からなる群から選択される少なくとも一つを検出するための請求の範囲 10 記載のバイオマーカー。
12. 請求の範囲 1 から 9 のいずれかに記載のポリペプチドを認識可能な抗体。
13. モノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体である請求の範囲 12 記載の抗体。

14. Notchシグナル伝達、細胞分化、腫瘍、アポトーシスおよびアルツハイマー病からなる群から選択される少なくとも一つを検出する試薬であって、請求の範囲12または13記載の抗体を含む試薬。
- 5 15. 請求の範囲1から9に記載のポリペプチドをコードする遺伝子。
16. DNA若しくはRNAである請求の範囲15記載の遺伝子。
- 10 17. 請求の範囲15または16記載の遺伝子を組み込んだベクター。
18. 請求の範囲17記載のベクターにより形質転換された形質転換体。

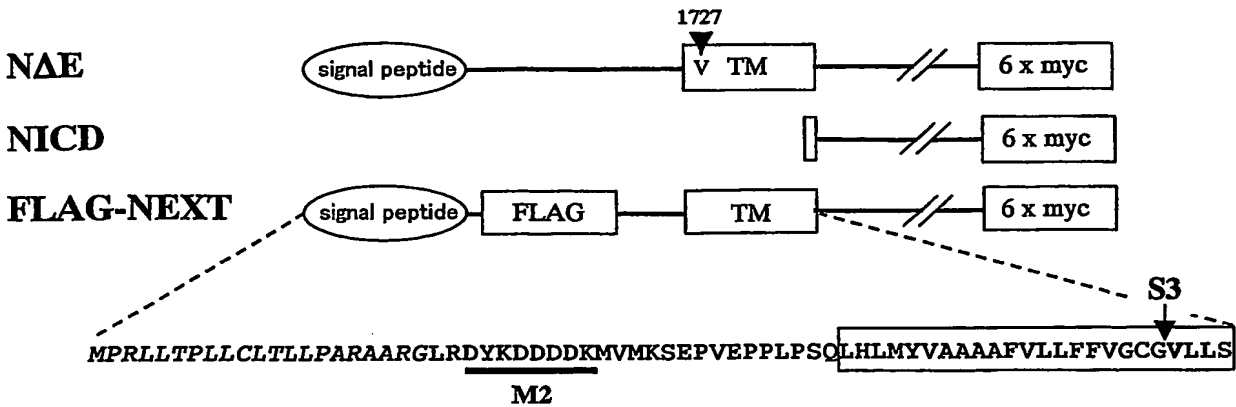


FIG.1A

FIG.1B

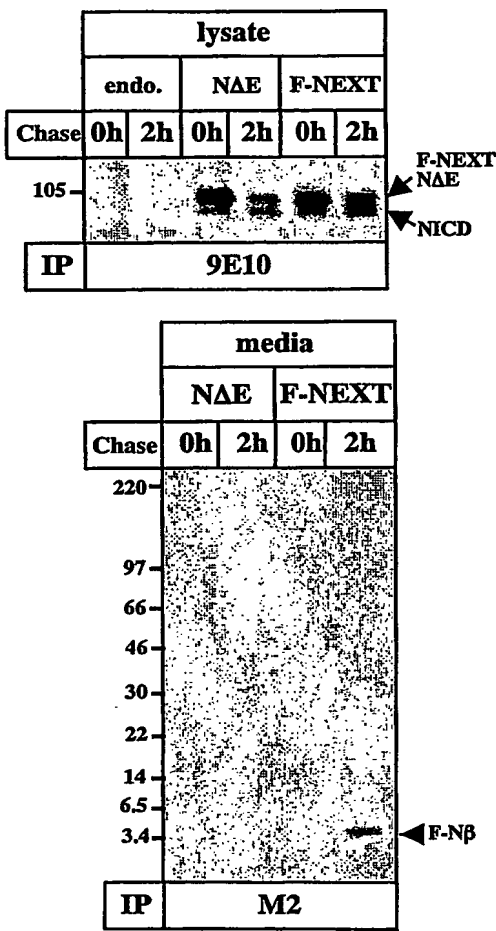
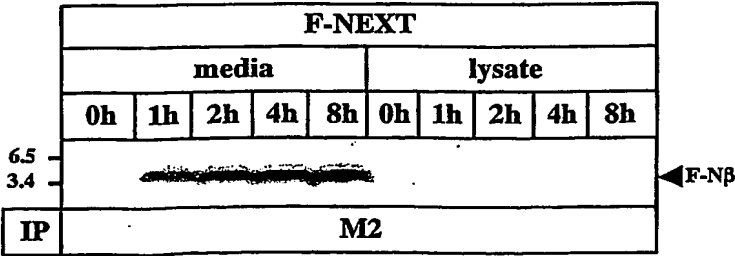
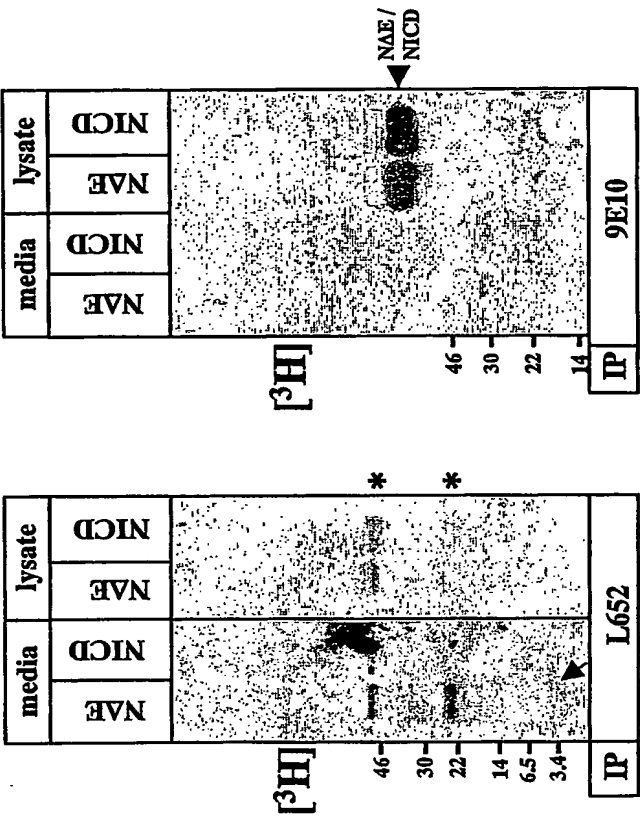


FIG.1C





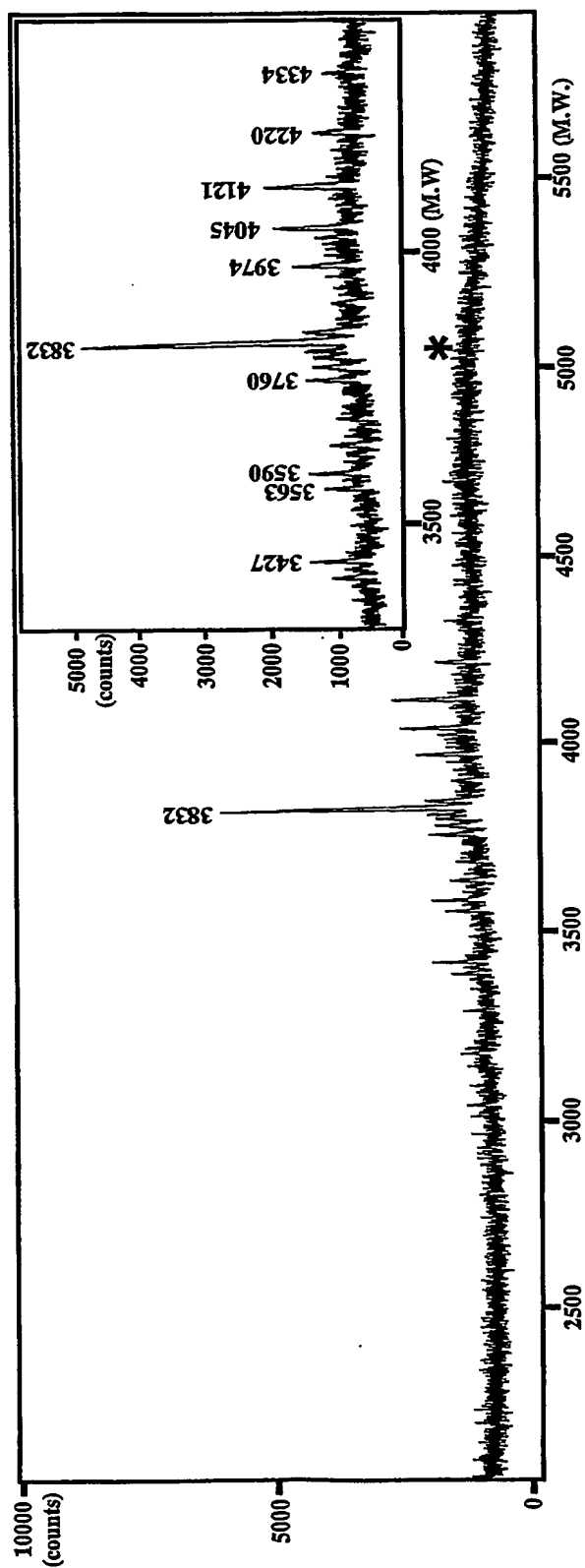


FIG.3A

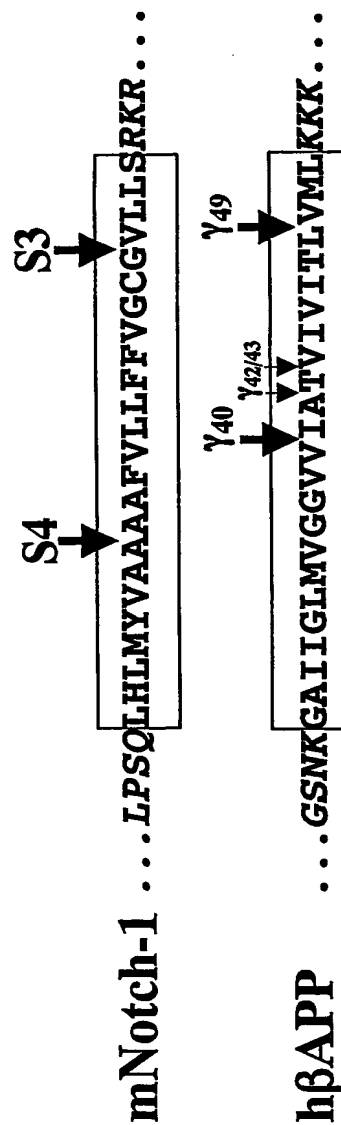


FIG.3B

FIG.4A

		TM	
N-LRDYKDDDDDKMVKSEPV	LRLPSQ	LHLMYVAAAAAFVLLFFV	GCG ¹⁷⁴³ -C
N-LRDYKDDDDDKMVKSEPV	LRLPSQ	LHLMYVAAAAAFV ¹⁷³⁶ -C	(M.W. 5057.67)
N-LRDYKDDDDDKMVKSEPV	LRLPSQ	LHLMYVAAAAAFV ¹⁷³⁵ -C	(M.W. 4333.81)
N-LRDYKDDDDDKMVKSEPV	LRLPSQ	LHLMYVAAAAAF ¹⁷³⁴ -C	(M.W. 4220.66)
N-LRDYKDDDDDKMVKSEPV	LRLPSQ	LHLMYVAAAA ¹⁷³³ -C	(M.W. 4121.53)
N-LRDYKDDDDDKMVKSEPV	LRLPSQ	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	(M.W. 3974.36)
N-LRDYKDDDDDKMVKSEPV	LRLPSQ	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	(M.W. 4045.45)
N-LRDYKDDDDDKMVKSEPV	LRLPSQ	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	(M.W. 3832.22)
N-LRDYKDDDDDKMVKSEPV	LRLPSQ	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	(M.W. 3562.89)
N-LRDYKDDDDDKMVKSEPV	LRLPSQ	LHLMYVAA ¹⁷³⁰ -C	(M.W. 3761.15)
N-LRDYKDDDDDKMVKSEPV	LRLPSQ	LHLMY ¹⁷²⁸ -C	(M.W. 3590.95)
N-LRDYKDDDDDKMVKSEPV	LRLPSQ	LHLM ¹⁷²⁷ -C	(M.W. 3427.78)

FIG.4B

mNotch-1	LHLMYVAA ¹⁷³⁶ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁵ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁴ -C	LHLMYVAA ¹⁷³³ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁰ -C	LHLMY ¹⁷²⁸ -C	LHLM ¹⁷²⁷ -C
hNotch-1	LHLMYVAA ¹⁷³⁶ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁵ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁴ -C	LHLMYVAA ¹⁷³³ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁰ -C	LHLMY ¹⁷²⁸ -C	LHLM ¹⁷²⁷ -C
mNotch-2	LHLMYVAA ¹⁷³⁶ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁵ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁴ -C	LHLMYVAA ¹⁷³³ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁰ -C	LHLMY ¹⁷²⁸ -C	LHLM ¹⁷²⁷ -C
hNotch-2	LHLMYVAA ¹⁷³⁶ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁵ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁴ -C	LHLMYVAA ¹⁷³³ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁰ -C	LHLMY ¹⁷²⁸ -C	LHLM ¹⁷²⁷ -C
mNotch-3	LHLMYVAA ¹⁷³⁶ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁵ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁴ -C	LHLMYVAA ¹⁷³³ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁰ -C	LHLMY ¹⁷²⁸ -C	LHLM ¹⁷²⁷ -C
hNotch-3	LHLMYVAA ¹⁷³⁶ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁵ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁴ -C	LHLMYVAA ¹⁷³³ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁰ -C	LHLMY ¹⁷²⁸ -C	LHLM ¹⁷²⁷ -C
mNotch-4	LHLMYVAA ¹⁷³⁶ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁵ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁴ -C	LHLMYVAA ¹⁷³³ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁰ -C	LHLMY ¹⁷²⁸ -C	LHLM ¹⁷²⁷ -C
hNotch-4	LHLMYVAA ¹⁷³⁶ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁵ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁴ -C	LHLMYVAA ¹⁷³³ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁰ -C	LHLMY ¹⁷²⁸ -C	LHLM ¹⁷²⁷ -C
hAPP	LHLMYVAA ¹⁷³⁶ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁵ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁴ -C	LHLMYVAA ¹⁷³³ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C	LHLMYVAA ¹⁷³⁰ -C	LHLMY ¹⁷²⁸ -C	LHLM ¹⁷²⁷ -C

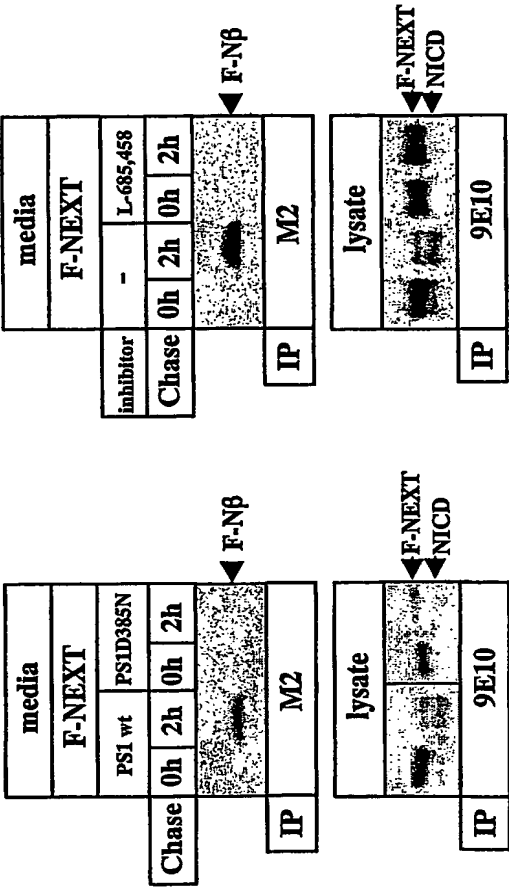


FIG.5B

FIG.5A

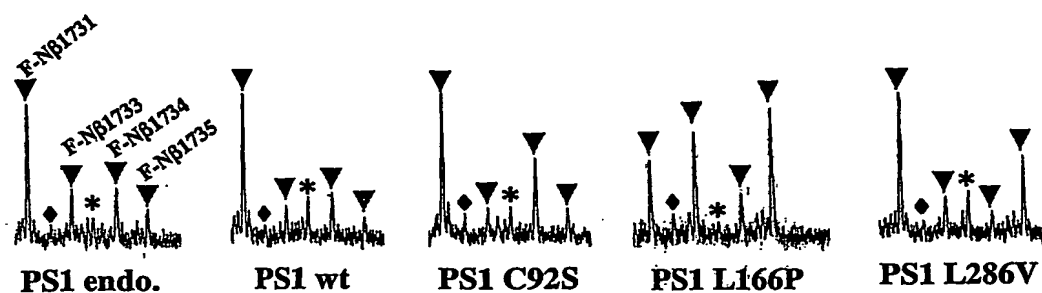


FIG.6A

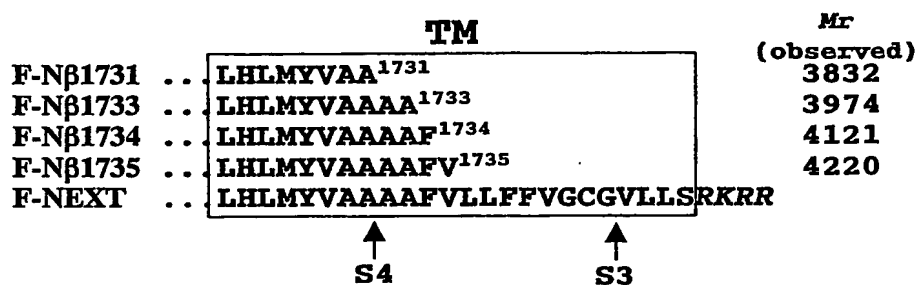


FIG.6B

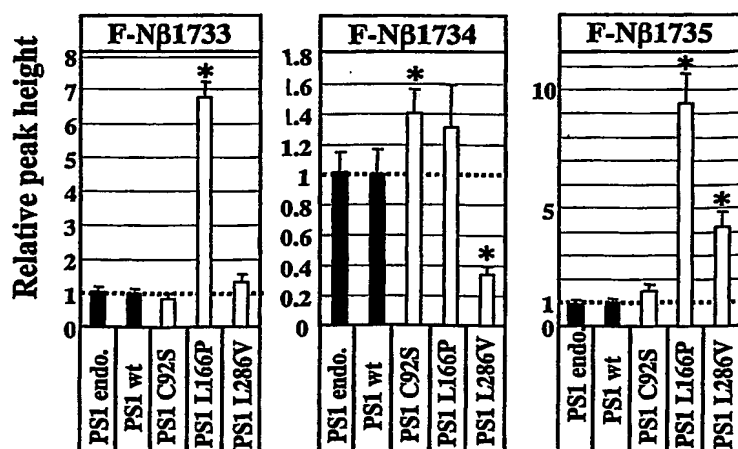


FIG.6C

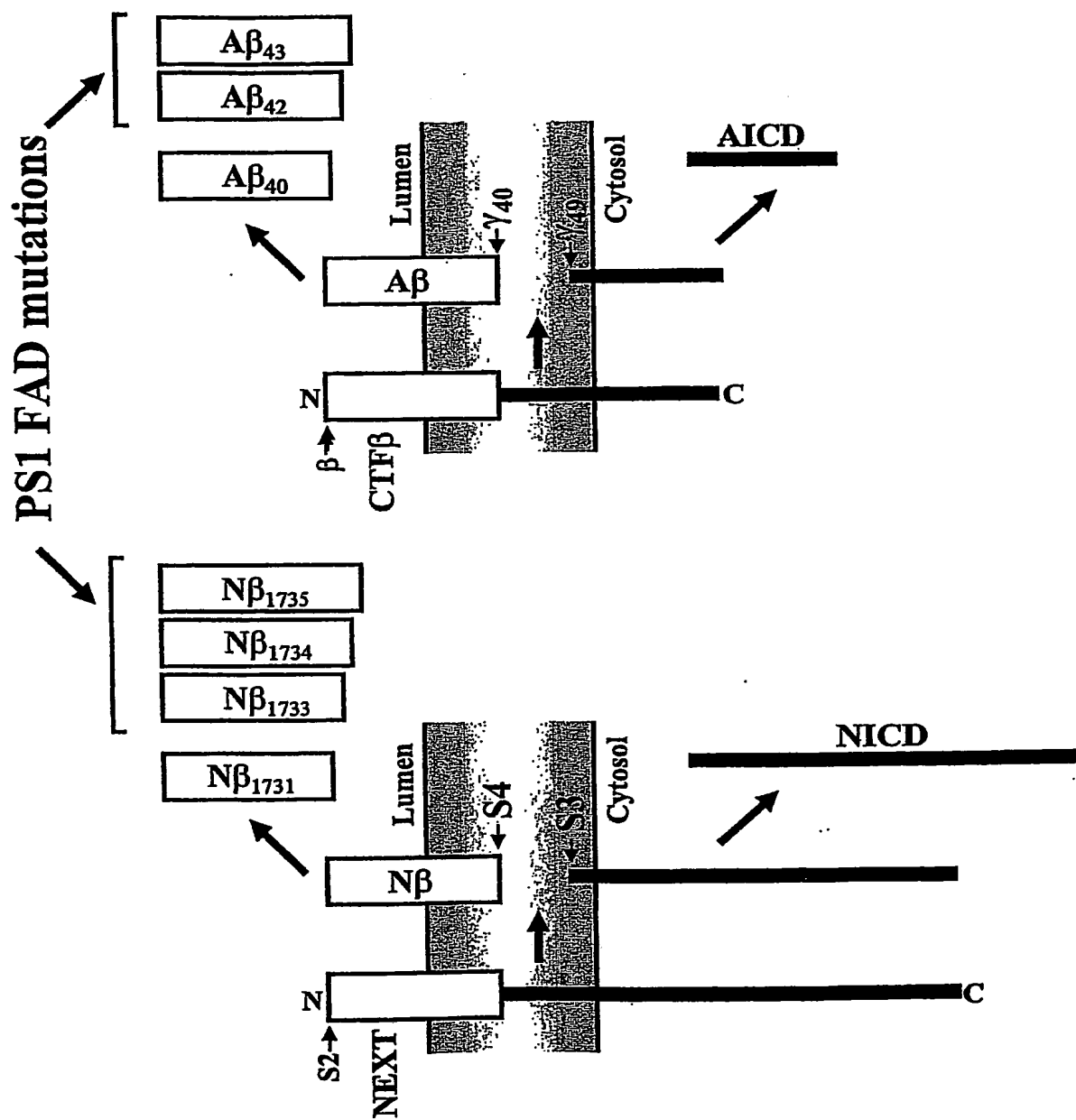


FIG.7

FIG.8A

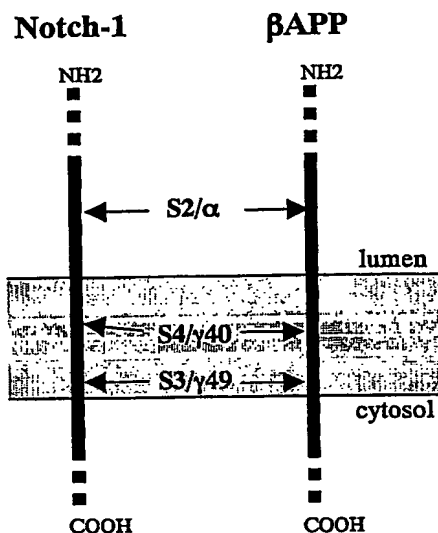


FIG.8B

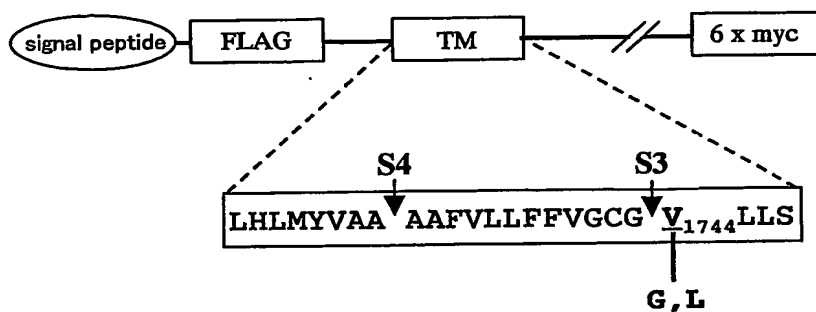


FIG.8C

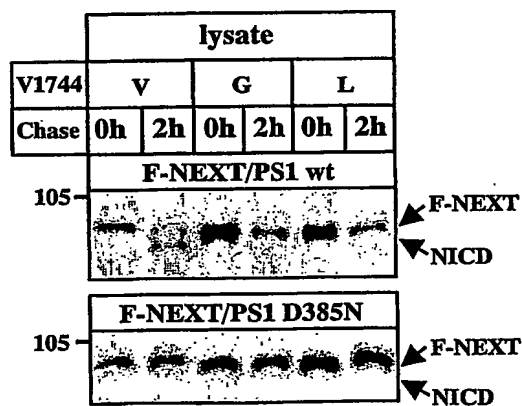


FIG.8D

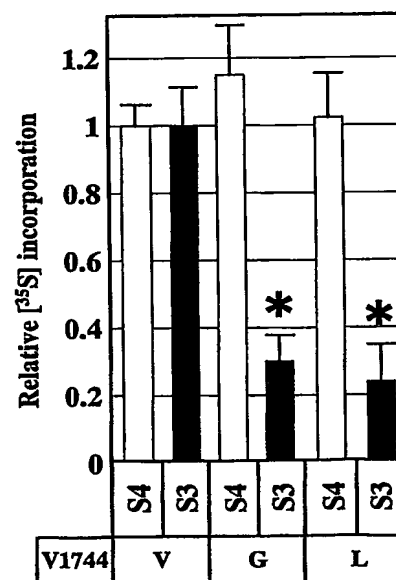
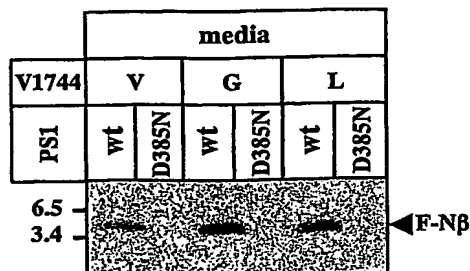


FIG.8E

FIG.9A

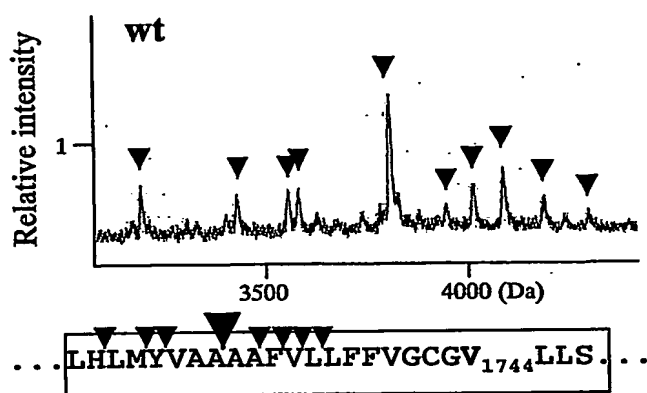


FIG.9B

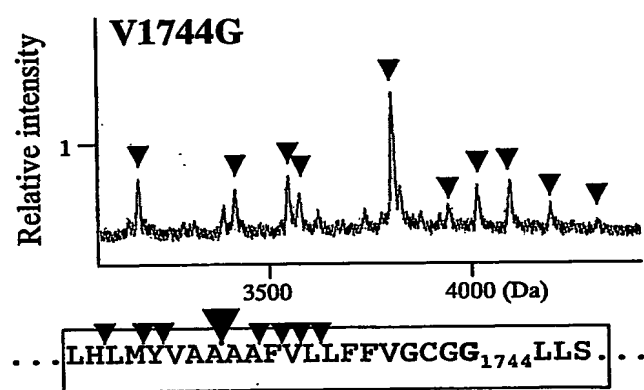
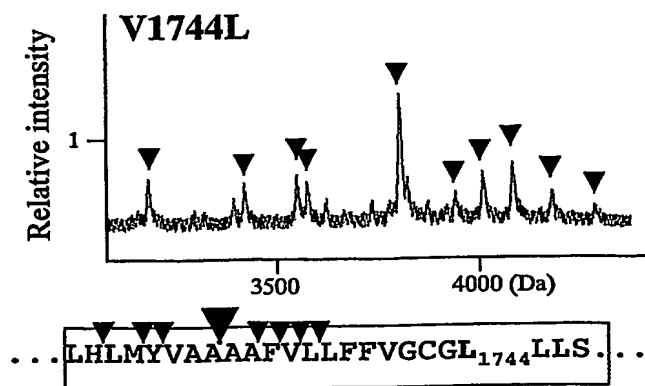


FIG.9C



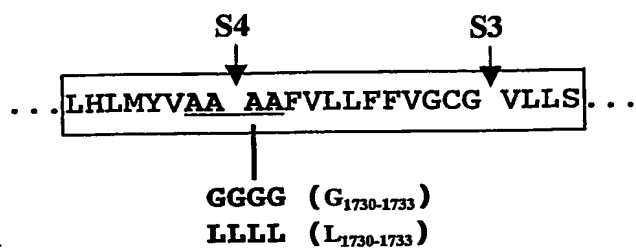


FIG. 10A

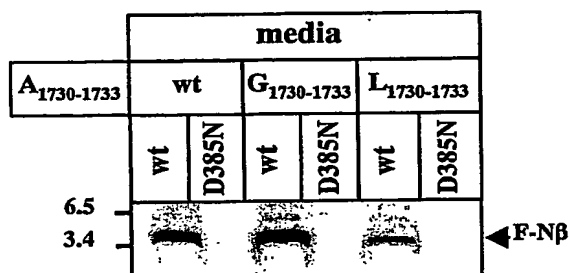


FIG.10B

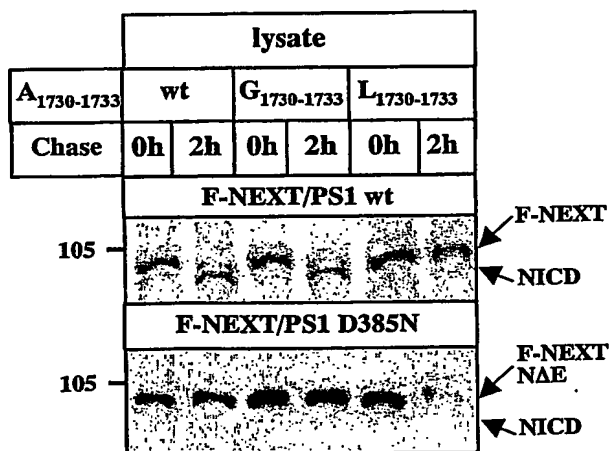


FIG. 10C

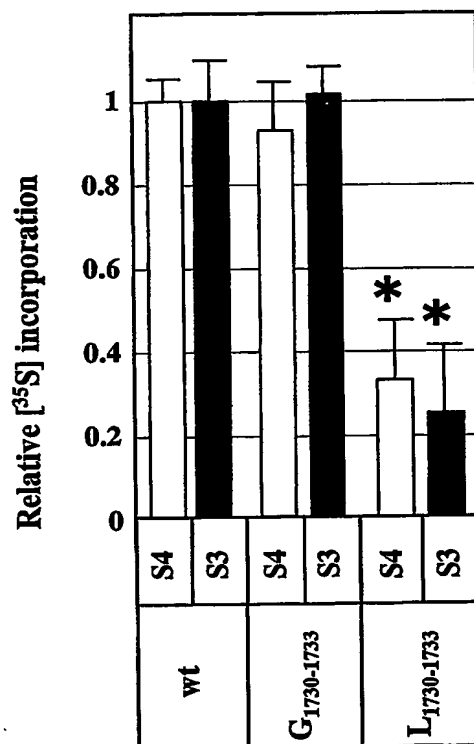


FIG.10D

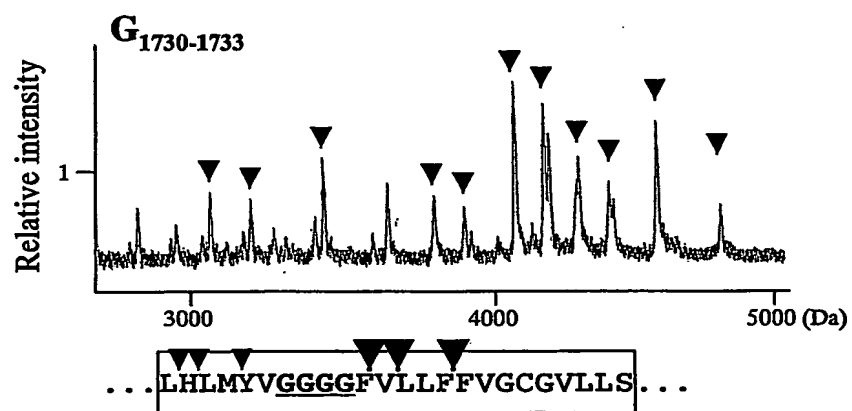


FIG.11A

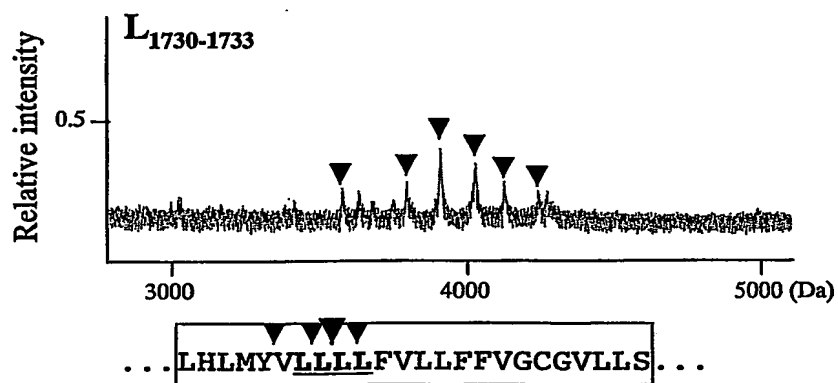


FIG.11B

SEQUENCE LISTING

<110> Osaka Industrial Promotion Organization

<120> New polypeptide originated from Notch

5

<150> JP2002-210040

<151> 2002-07-18

<160> 22

10

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> mouse

15 <400> 1

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

1

5

10

15

Val Ala Ala

20

20

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> mouse

25 <400> 2

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met

1 5 10 15

<210> 3

<211> 18

5 <212> PRT

<213> mouse

<400> 3

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

1 5 10 15

10

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> mouse

15 <400> 4

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala

20

20

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> mouse

25 <400> 5

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala Ala Ala

20

5 <210> 6

<211> 23

<212> PRT

<213> mouse

<400> 6

10 Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala

20

15 <210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> mouse

<400> 7

20 Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala Phe

20

25 <210> 8

<211> 25

<212> PRT

<213> mouse

<400> 8

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

5 1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala Phe Val

20 25

<210> 9

10 <211> 26

<212> PRT

<213> mouse

<400> 9

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

15 1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu

20 25

<210> 10

20 <211> 17

<212> PRT

<213> human

<400> 10

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met

25 1 5 10 15

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> human

5 <400> 11

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

1

5

10

15

<210> 12

10 <211> 20

<212> PRT

<213> human

<400> 12

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

15

1

5

10

15

Val Ala

20

<210> 13

20 <211> 21

<212> PRT

<213> human

<400> 13

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

25

1

5

10

15

Val Ala Ala

20

<210> 14

<211> 22

5 <212> PRT

<213> human

<400> 14

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

1

5

10

15

10 Val Ala Ala Ala

20

<210> 15

<211> 23

15 <212> PRT

<213> human

<400> 15

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

1

5

10

15

20 Val Ala Ala Ala Ala

20

<210> 16

<211> 24

25 <212> PRT

<213> human

<400> 16

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala Phe

5 20

<210> 17

<211> 25

<212> PRT

10 <213> human

<400> 17

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala Phe Val

15 20 25

<210> 18

<211> 26

<212> PRT

20 <213> human

<400> 18

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu

25 20 25

<210> 19

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial

5 <400> 19

atcgtcgtcc ttgtagtcct tcaagcctct tgcgccgagc gcgggcagca gcgttag 57

<210> 20

<211> 54

10 <212> DNA

<213> Artificial

<400> 20

gacaagaagg tgatgaagag tgagccgggtg gagcctccgc tgccctcgca gctg 54

15 <210> 21

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 21

20 cctcgagct gcacctcatg tacgtggcag cg 32

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

25 <213> Artificial

<400> 22

cgctgccacg tacatgaggt gcagctgcga

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/09059

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K7/08, C07K14/47, C07K16/18, C12N15/12, C12N1/15,
C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, G01N33/563

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K7/08, C07K14/47, C07K16/18, C12N15/12, C12N1/15,
C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, G01N33/563

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Merlos-Suarez A. et al., Pro-tumor necrosis factor-alpha processing activity is tightly controlled by a component that does not affect notch processing., J.Biol.Chem., 1998, Vol.273, No.38, p.24955-62	1-18
A	Schlondorff J. et al., Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding., J.Cell.Sci., 1999, Vol.112, No.Pt 21, p.3603-17	1-18
A	Chan YM et al., Roles for proteolysis and trafficking in notch maturation and signal transduction., Cell, 1998, Vol.94, No.4, p.423-6	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01 October, 2003 (01.10.03)

Date of mailing of the international search report
14 October, 2003 (14.10.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09059

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Brou C. et al., A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE., Mol.Cell., 2000, Vol.5, No.2, p.207-16	1-18

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl⁷ C07K7/08, C07K14/47, C07K16/18, C12N15/12, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, G01N33/563

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl⁷ C07K7/08, C07K14/47, C07K16/18, C12N15/12, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, G01N33/563

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN), JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Merlos-Suarez A et al, Pro-tumor necrosis factor-alpha processing activity is tightly controlled by a component that does not affect notch processing., J Biol Chem., 1998, Vol. 273, No. 38, p. 24955-62.	1-18
A	Schlondorff J et al, Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding., J Cell Sci., 1999, Vol. 112, No. Pt 21, p. 3603-17.	1-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.10.03

国際調査報告の発送日

14.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

印

4B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Chan YM et al, Roles for proteolysis and trafficking in notch maturation and signal transduction., Cell, 1998, Vol. 94, No. 4, p. 423-6.	1 - 1 8
A	Brou C et al, A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE., Mol Cell., 2000, Vol. 5, No. 2, p. 207-16.	1 - 1 8